



過酸化水素光分解殺菌法による短時間処理が残存細菌に及ぼす影響

著者	小田島 優
号	40
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	歯博第660号
URL	http://hdl.handle.net/10097/58132

氏 名（本籍）： お だ し ま 小田島 ゆう 優

学 位 の 種 類： 博 士 （ 歯 学 ） 学 位 記 番 号： 歯 博 第 6 6 0 号

学位授与年月日： 平成 2 6 年 3 月 2 6 日 学位授与の要件： 学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科・専攻： 東北大学大学院歯学研究科（博士課程）歯科学専攻

学位論文題目： 過酸化水素光分解殺菌法による短時間処理が残存細菌に及ぼす影響

論文審査委員：（主査）教授 庭 野 吉 己
教授 佐々木 啓 一 教授 高 橋 信 博

論 文 内 容 要 旨

[目的] これまで著者は、過酸化水素を青色可視光で光分解することにより生成するヒドロキシルラジカルを用いた治療法（過酸化水素光分解殺菌法）の研究を行ってきた。これまでの研究で、口腔内細菌やデンチャープラークなどに対して強い殺菌効果が認められることを実証した。しかしながら、処理後に残存する細菌への影響は、未だ確認されていない。抗菌薬に短時間暴露後の細菌増殖の遅延は、Postantibiotic Effect (PAE) として知られおり、過酸化水素光分解殺菌法においても細菌の増殖抑制効果が期待できる。また、活性酸素は細胞組織を非特異的に酸化させるので、耐性獲得のリスクは低いと考えられている。したがって本研究では、過酸化水素光分解殺菌法のPAEの検証と、耐性獲得のリスク評価として本殺菌法反復暴露における感受性試験を行い、処理後の細菌への影響について明らかにすることを目的とした。

[方法] PAE試験では、過酸化水素光分解殺菌処理後の菌液をBHI液体培地に添加し、濁度の計測を行い、増殖曲線を求めた。また、処理後の菌液をBHI寒天培地で培養し、16, 20, 24, 36時間後のコロニーの写真を撮影し、コロニー面積の評価を行った。耐性誘導試験では、7菌種を用いて実験を行った。本試験では、細菌が死滅しない条件設定が必要であり、レーザー照射時間をコントロールして各菌種それぞれの生菌数が2-log程度減少する時間を事前に設定した。過酸化水素光分解殺菌法により処理した菌液の生菌数を培養法により算出するとともに、培養した菌を再び前培養し次の試験に用いた。このようにして同様の殺菌処理を40回繰り返し行った。

[結果および考察] 本試験で用いた2菌種において、液体培地におけるPAEは過酸化水素濃度およびレーザー照射時間依存的に増加した。また、寒天培地で培養した場合にも、過酸化水素とレーザー照射を併用した場合、有意な成長の遅延が認められた。耐性誘導試験では、過酸化水素光分解殺菌処理を40回繰り返し行っても、今回試験に用いたすべての菌種で感受性の低下は認められず、耐性獲得の

リスクは少ないことが示唆された。これに対して、抗生剤を用いた試験では、試験に用いた4菌種すべてにおいて、1種類以上の抗生剤に対して10回の繰り返し暴露の間に感受性の低下が認められた。本殺菌処理の活性本体であるヒドロキシルラジカルは非選択的に細胞膜脂質、タンパク質および核酸などの細胞の構成要素や代謝経路に酸化的傷害を与えるため、一旦細胞が損傷を受けるとこれら高分子の修復のために時間をかけて再合成が行われ、結果としてPAEが発現すると考察している。加えて、本試験成績は、非選択的な傷害性のために、本殺菌処理に対して細菌が特異的な耐性機構を構築できない可能性も強く示唆している。

〔結語〕 過酸化水素光分解殺菌技術処理後の細菌への影響をみた本研究により、本技術が既存抗生物質と同等以上の優位性を有していることが示された。

審査結果要旨

申請者が所属する分野では、これまで過酸化水素（ H_2O_2 ）を青色可視光で光分解することにより生成するヒドロキシルラジカルを用いた治療法（過酸化水素光分解殺菌法）の研究を行い、口腔内細菌やデンチャープラークなどに対して強い殺菌効果が認められることを実証してきた。しかし、処理後に残存する細菌への影響は、未だ確認されていない。申請者は、Postantibiotic Effect（PAE）として知られている抗菌薬に短時間暴露後の細菌増殖の遅延が本殺菌法においても期待できると考えた。加えて、活性酸素は細胞組織を短時間で非特異的に酸化させるので、本殺菌法に対する耐性獲得のリスクは低いという仮説を立てた。本論文は、本殺菌法のPAEの検証と、耐性獲得のリスク評価として本殺菌法反復暴露における感受性試験を行い、処理後の細菌への影響について明らかにすることを目的としたものである。

PAE試験では、本殺菌法処理後の菌液を液体培地に添加し、濁度の経時的計測を行い、増殖曲線を求めた。また、処理後の菌液を寒天培地で培養し、経時的にコロニー面積の評価を行った。耐性誘導リスク評価試験では、細菌が完全には死滅しない条件設定が必要であり、レーザー照射時間をコントロールして供試7菌種それぞれの生菌数が2-log程度減少する時間を設定した。本殺菌法により処理した菌液の生菌数を培養法により算出するとともに、算出後菌を再び前培養し次の試験に用いた。同様の操作を40回繰り返し行い、菌の感受性の変化を検討した。

PAE試験の結果、供試2菌種いずれにおいても、液体培地におけるPAEは H_2O_2 濃度およびレーザー照射時間依存的に増加した。また、寒天培地で培養した場合にも、 H_2O_2 とレーザー照射を併用することで、菌の成長が有意に遅延することを明らかにした。耐性誘導のリスク評価試験では、本殺菌処理を40回繰り返し行っても、今回試験に用いたすべての菌種で感受性の低下は認められず、耐性獲得のリスクは少ないことが示唆された。一方、抗生剤を用いた繰り返し曝露試験では、供試4菌種すべてにおいて、1種類以上の抗生剤に対する感受性の低下が認められた。本殺菌処理の活性本体であるヒドロキシルラジカルは短時間で非選択的に細胞膜脂質、タンパク質および核酸などの細胞の構成要素や代謝経路に酸化的傷害を与えるため、一旦、細胞が損傷を受けるとこれら高分子の修復のために時間をかけて再合成が行われ、結果としてPAEが発現すると考察した。加えて、非選択的な傷害性のために、本殺菌処理に対して細菌が特異的な耐性機構を構築できない可能性も強く示唆している。

本研究により、処理後の細菌への影響という観点からも、本殺菌技術が口腔内細菌に対して有効であることを明示したものであり、新しい治療開発、歯科医療の発展に大きく貢献するものである。よって、本論文は博士（歯学）に相応しいものと判断する。